



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

**O EXERCÍCIO FÍSICO NEUROMUSCULAR AGUDO
PROMOVE RESPOSTAS NOS NÍVEIS CIRCULANTES DO
miR-146a EM IDOSOS COM DIABETES DO TIPO 2**

GILBERTO SANTOS MORAIS JUNIOR

São Cristóvão

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

O EXERCÍCIO FÍSICO NEUROMUSCULAR AGUDO
PROMOVE RESPOSTAS NOS NÍVEIS CIRCULANTES DO
miR-146a EM IDOSOS COM DIABETES DO TIPO 2

GILBERTO SANTOS MORAIS JUNIOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Jerônimo dos Santos Silva

São Cristóvão

2017

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

M827e Morais Junior, Gilberto Santos
O exercício físico neuromuscular agudo promove respostas nos níveis circulantes do miR-146a em idosos com diabetes do tipo 2 / Gilberto Santos Morais Junior; orientador Roberto Jerônimo dos Santos Silva. – São Cristóvão, 2017.
47 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Educação Física – Aspectos da saúde. 2. Diabetes. 3. Diabetes em idosos. 4. Exercícios físicos – Aspectos da saúde. I. Silva, Roberto Jerônimo dos Santos, orient. II. Título.

CDU: 796:616

GILBERTO SANTOS MORAIS JUNIOR

**O EXERCÍCIO FÍSICO NEUROMUSCULAR AGUDO
PROMOVE RESPOSTAS NOS NÍVEIS CIRCULANTES DO
miR-146a EM IDOSOS COM DIABETES DO TIPO 2**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Educação Física.

Aprovada em ____/____/____

1º Examinador: Prof. Dr Roberto Jerônimo dos Santos Silva

2º Examinador: Prof. Dr. Otávio de Toledo Nóbrega

3º Examinador: Prof. Dr. Ciro José Brito

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer a Deus por ter permitido chegar aonde eu cheguei e por ter me dado a família que eu tenho hoje.

Um agradecimento especial para minha mãe, Maria Eucaristia Fontes Xavier, pelo apoio e todo o ensinamento. A senhora é meu alicerce sem teus conselhos não era possível chegar aonde eu estou. Te amo mãe. Aos meus irmãos Ricardo Henrique, Kátia Christina e a minha sobrinha Nathália obrigado pelo apoio e pelo incentivo prestado. Agradeço também a minha cunhada Maria Oliveira pelos conselhos e incentivo para trilhar a carreira acadêmica.

Cabe aqui também agradecer a família Xavier, aos tios e tias e todos os primos por todo o carinho e conselhos durante todos esses anos de nossas vidas. Todos vocês participaram direta e indiretamente dessa conquista.

Gostaria de agradecer a minha namorada, companheira e melhor amiga Jucicleide Alves pelo incentivo e paciência durante esses dois anos, sei que não foi fácil toda a minha ausência, mesmo assim você esteve esse tempo todo ao meu lado. Te amo. Ao meu sogro e sogra Almir da Cruz e Josineide Alves pelos conselhos e incentivo e também gostaria de agradecer a meu cunhado Valdir Erisson, vocês fazem parte da minha família.

A meu grande amigo e irmão que a vida me deu Luan Moraes pelos conselhos e apoio prestado em todos esses anos de amizade. A meus amigos de Brasília Vinicius Carolino, Lorena Carolino, Wilcelly Machado, Adriane Dallanora, por todo o suporte prestado durante as minhas idas a capital e também por todo o aprendizado que tive com vocês no laboratório.

Não poderia esquecer dos meus mentores Prof. Dr. Roberto Jerônimo dos Santos Silva e Prof. Dr. Ciro José Brito, por todo conhecimento adquirido durante todos esses anos de UFS e pela oportunidade que vocês me deram de adentrar nessa área da Genética e Exercício. Cabe aqui também agradecer ao Prof. Dr. Otávio de Toledo Nóbrega pelo acolhimento no seu grupo de pesquisa e por todo o aprendizado durante esses dois anos de mestrado, ainda tenho muito para aprender com vocês.

Gostaria de agradecer ao grupo de pesquisa de qual eu faço parte, Núcleo de Estudos, Pesquisa e Extensão "UFS em Movimento", um agradecimento a todos os colegas e

amigos de pesquisa, em especial a Andressa Melo, Danilo Moraes, Josy e Walfran, vocês estiveram durante todo o processo de coleta de dados, tornando possível essa pesquisa.

Cabe aqui também agradecer a todos os idosos que de livre e espontânea vontade participaram da pesquisa, sem os senhores nada disso seria possível e não poderia esquecer de agradecer a todo o suporte da Secretaria de Saúde de Cedro de São João em especial ao secretário de saúde e também amigo de mestrado Danilo Moraes.

A quaisquer outros que embora não foram citados, mas participaram direta ou indiretamente dessa conquista.

O meu mais sincero sentimento de gratidão.

RESUMO

O diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) caracteriza-se por defeitos na ação e secreção da insulina e na regulação da produção hepática de glicose. O exercício físico aparece como uma das principais formas de prevenção e controle do DM2. A literatura vem sugerindo que os MicroRNAs circulantes (126, 146a e 155), apresentam uma relação inversamente proporcional entre taxas glicêmicas e o estado pró-inflamatório decorrentes do DM2. Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar o efeito agudo de dois tipos de intervenções (cardiovascular e neuromuscular) sobre as concentrações circulantes totais dos miRs 126, 146a e 155 em idosos portadores do DM2. Participaram do estudo 23 idosos ($68,23 \pm 5,31$ anos), de ambos os sexos, sendo 13 portadores do DM2 (controlados) e dez não diabéticos denominados, respectivamente, Grupo 1 e 2. Estes foram submetidos a dois tipos de intervenções: circuito neuromuscular e caminhada orientada, realizadas com a intensidade entre 60% a 70% da frequência cardíaca de reserva. A expressão dos miRNAs foi realizada através do método Real Time Quantitative PCR (qPCR) e foi adotado a análise de covariância (ANCOVA) considerando os valores basais como co-variável. Em todas as análises foi utilizado nível de significância de 5%. Enquanto principais resultados verificam-se que os valores basais (co-variável), está significativamente relacionada com a magnitude do efeito do miR-146a frente a intervenção neuromuscular $F(1, 23) = 166,31$; $p < 0,001$. Também houve um significativo efeito nos níveis circulantes do miR-146a em face de o paciente ser ou não diabético com elevações substancialmente maior que os incrementos exibidos pelo os não diabéticos, frente a intervenção 1, verificando-se $F(2, 23) = 54,33$; $p < 0,001$. Conclui-se que a intervenção neuromuscular, quando realizada em forma de circuito, altera os níveis circulantes totais do miR-146a, podendo reduzir os níveis inflamatórios decorrentes do DM2.

Palavras-Chave: Diabetes Mellitus; Exercício Físico; MicroRNAs.

ABSTRACT

Diabetes mellitus type 2 (DM2) is characterized by defects in the action and secretion of insulin and in the regulation of hepatic glucose production. The physical exercise appears as one of the main ways of prevention and control of DM2. The literature suggests that circulating microRNAs (126, 146a and 155) have an inversely proportional relationship between glycemic rates and the pro-inflammatory state resulting from DM2. Thus, the aim of this study was to analyze the acute effect of two types of interventions (cardiovascular and neuromuscular) on the total concentrations of circulating of the miRs 126, 146a and 155 in elderly patients with DM2. The study included 23 individuals (68.23 ± 5.31 years), of both genders, 13 patients with DM2 (controlled) and 10 non-diabetics, referred to, Group 1 and 2, respectively. These were subjected to two types of interventions: neuromuscular circuit and walk oriented, carried out with the intensity between 60% to 70% of heart rate reserve. The expression of miRNAs was performed using the method Real Time Quantitative PCR (qPCR) and was adopted the analysis of covariance (ANCOVA) whereas the measurements of baseline as co-variable. In all analyzes was used a significance level of 5%. While main results verify that the baseline (co-variable), is significantly related with the magnitude of the effect of miR-146a forward to intervention neuromuscular $F(1, 23) = 166.31$; $p < 0.001$. There was also a significant effect on circulating levels of miR-146a in the face of the patient or may not be a diabetic with elevations substantially higher than the elevations shown by the non-diabetics, in front of the intervention 1, $F(2, 23) = 54.33$, $p < 0.001$. It is concluded that neuromuscular intervention, when performed as a circuit, changes the total circulating levels of miR-146a and may reduce the inflammatory levels resulting from DM2.

Keywords: Diabetes Mellitus; Physical Exercise; MicroRNAs.

Lista de Figuras

Figura 1 - Delineamento experimental do estudo.....	8
Figura 2 - Representação esquemática do Circuito Neuromuscular.....	10
Figura 3 – 1A e 1B Comparação entre grupos (valores basais)	22
Figura 4 – 2A e 2B Comparação da magnitude do efeito frente as intervenções entre grupos.....	23

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características antropométricas da amostra.....	21
---	----

Lista de Abreviaturas

1RM- Uma Repetição Máxima

ADA- Associação Americana de Diabetes

ANCOVA- Análise de Covariância

CC- Circunferência Cintura

CDNA- DNA Complementar

c-miRNAs- miRNAs Circulante

CQ- Circunferência Quadril

CT- Amplification Threshold (Limiar de Amplificação)

DCM- Doenças Cardiometabólicas

DM- Diabetes Mellitus

DM1- Diabetes Mellitus do Tipo 1

DM2- Diabetes Mellitus do Tipo 2

DNA- Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

DP- Desvio Padrão

EDTA- Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)

EP- Erro Padrão

FC- Frequência Cardíaca

FC_{máx}- Frequência Cardíaca Máxima

FC_{rep}- Frequência Cardíaca Repouso

FC_{res}- Frequência Cardíaca Reserva

GLUT4- Transportador de Glicose do Tipo 4

HDL- Lipoproteínas de Alta densidade

IC- Índice Cintura

IMC- Índice Massa Corporal

MC- Massa Corporal

miRNAs- Micro RNAs

MRNAs- RNAs Mensageiros

OMS- Organização Mundial da Saúde

PCR- Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

QPCR- Real Time Quantitative PCR

RNA- Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)

TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UTR- Untranslated Region (Regiões não Traduzidas)

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	6
3 MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1 <i>Amostra e Critérios de Inclusão/Exclusão</i>	7
3.2 <i>Características antropométricas</i>	7
3.3 <i>Delineamento Experimental</i>	8
3.4 <i>Aquecimento e Volta à Calma</i>	9
3.5 <i>Circuito Neuromuscular (Intervenção 1)</i>	9
3.6 <i>Caminhada orientada (Intervenção 2)</i>	10
3.7 <i>Procedimento de coleta do sangue</i>	11
3.8 <i>Extração de RNA total</i>	11
3.9 <i>Eficiência de Amplificação</i>	11
3.10 <i>Análise por qPCR</i>	12
3.11 <i>Tratamento estatístico</i>	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5 CONCLUSÕES	27
6 REFERÊNCIAS	28
ANEXO	34

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a população de idosos vem crescendo rapidamente no mundo, e durante esse processo de envelhecimento o corpo humano passa por uma série de alterações, fisiológicas e metabólicas naturais que podem levar a pessoa idosa a um estado de doença, fator que pode contribuir com o aumento do risco de mortalidade dessa população¹. Dentre essas alterações, são destacadas: a diminuição das capacidades funcionais dos órgãos e tecidos; alterações nas funções metabólicas; diminuição da massa óssea; sarcopenia e a diminuição/redistribuição da gordura corporal^{2,3}. Essas alterações levam o idoso a um estado de inatividade física e, conseqüentemente, ao aumento do risco de acometimento por doenças cardiometabólicas, principalmente o diabetes⁴⁻⁶.

O diabetes mellitus (DM) é um conjunto de distúrbios (metabólicos, crônicos e endócrinos) resultantes da não produção de insulina e também do defeito na ação da insulina produzida⁷. Devido a sua fisiopatologia, o DM induz o corpo humano a uma série de complexas modificações metabólicas, vasculares e neuropáticas, e a associação desses três fatores comprometem a função vascular levando o indivíduo a sofrer complicações cardiovasculares aumentando os índices de morbidade e mortalidade da população portadora do DM⁸.

O DM é um problema de saúde mundialmente conhecido, estima-se que a população de portadores do DM seja da ordem de 387 milhões de pessoas, podendo alcançar a casa dos 471 milhões de diabéticos até o ano de 2030, este crescimento é reflexo do envelhecimento populacional, bem como o aumento da prevalência de obesidade e sedentarismo⁹. No Brasil, os resultados da pesquisa nacional de saúde evidenciaram a influência da idade sobre a prevalência do DM, sendo observado um aumento significativo de 2,7% na faixa etária dos 30 aos 59 anos para 17,4% para a população entre 60 e 69 anos, evidenciando a alta prevalência do DM nos idosos¹⁰.

A Organização Mundial da Saúde (OMS), juntamente com a Associação Americana de Diabetes (ADA), classifica o DM em quatro formas distintas: DM do tipo 1 (DM1), DM do tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e o DM gestacional. O DM1 é caracterizado pela não produção de insulina decorrente da destruição das células betapancreáticas, responsáveis por sintetizar e secretar a insulina. É subdividido nos tipos 1A e 1B¹¹. O DM do tipo 1A também conhecido como autoimune, é

responsável por 5 a 10% dos casos do DM1, é resultante da destruição das células betapancreáticas, consequentemente a deficiência de insulina. O DM do tipo 1B (Idiopático) responsável pela minoria dos casos de DM1, é caracterizada pela ausência de marcadores de autoimunidade e apresenta graus variados de deficiência de insulina¹¹.

O segundo tipo, o DM2, é a forma mais comum da doença, é responsável por 90 a 95% dos casos, sendo caracterizado por defeitos na regulação da produção de glicose no fígado e deficiências na ação da insulina produzida, tendo como consequência a menor captação de glicose para dentro da célula, resultando em um estado de hiperglicemia sistêmica¹¹. Esta condição está diretamente associada à predisposição genética, à inatividade física e aos maus hábitos alimentares^{7,12}.

Quanto aos outros tipos específicos do DM, estes compreendem as formas menos comuns da doença, os quais os processos causadores são bastante variados, dentre eles: defeitos genéticos na função das células beta pancreáticas, disfunções na ação da insulina, doenças do pâncreas, endocrinopatias, infecções e podem até serem induzidas por medicamentos ou agentes químicos¹¹. Por fim o DM gestacional é considerada toda e qualquer intolerância à glicose durante o período de gestação acometendo 1 a 14% de todas as gestações e está associada com a resistência à insulina e com a diminuição da função das células beta, assemelhando-se com o DM2^{11,13}.

No que concerne ao DM2, a principal maneira de reduzir as complicações decorrentes desta patologia é feita através do controle da glicose circulante no organismo. Este controle pode ser realizado de duas maneiras, a farmacológica, a qual consiste no uso de fármacos antidiabéticos orais que têm como principal objetivo a redução dos níveis glicêmicos para os níveis normais (70 a 99mg/dl em jejum e 140mg/dl após uma refeição)¹⁴, e a não farmacológica, compreendida por alterações nos fatores comportamentais, tais quais a adequação da dieta e a adoção de práticas de exercícios físicos regulares^{7, 15}.

Os efeitos favoráveis do exercício para a saúde e controle dos diabéticos têm sido bem descrito na literatura^{16,17}. A prática de exercício físico regular promove benefícios na composição corporal, como: redução da gordura corporal, da gordura visceral e aumento da massa magra; aumento da força muscular bem como a melhoria da qualidade do movimento. Esses fatores atuam diretamente no controle glicêmico

dos portadores do DM2, reduzindo também os riscos e complicações provenientes da doença¹⁸.

Além disto, evidências Cloostermans *et al.*¹⁵ e Kalyani *et al.*¹⁹, demonstraram que o exercício físico, além de atuar diretamente no controle glicêmico, melhora também a sensibilidade dos tecidos à insulina, auxilia na diminuição da insulina circulante, altera as enzimas oxidativas, intensificando a ação dos transportadores de glicose dependentes de insulina (GLUT4), promove um aumento da captação de glicose sanguínea para os músculos através de mecanismos não dependentes de insulina.

O exercício físico, ainda quando somado há uma dieta adequada e com o uso de medicação, se torna a principal forma de tratamento e controle do DM2²⁰. Embora as evidências comprovem a eficácia do exercício físico no controle glicêmico, perfil lipídico no sangue, redução de gordura corporal e aumento da musculatura esquelética para os portadores do DM2^{21,22}, ainda não está bem descrito na literatura sobre qual tipo de intervenção é mais eficaz para o tratamento do DM2.

Quanto aos tipos de exercícios físicos utilizados para tratar a DM2, o exercício cardiovascular apresenta-se como o mais estudado na literatura científica. Exercícios como caminhadas, ciclismo, natação, dentre outros, por serem capazes de recrutar grandes grupos musculares são os que vem recebendo mais atenção na literatura²³. Já o exercício neuromuscular (resistido), usa de força muscular para vencer uma força de resistência imposta. São realizados por meio de máquinas, pesos livres (halteres) e podem ser realizados com o peso corporal trabalhando pequenos e grandes grupos musculares. Existem evidências que apoiam a adoção da prática desse tipo de exercício, como também as diretrizes publicadas para os portadores do DM2 recomendam não só o exercício cardiovascular mas como também o exercício neuromuscular^{24,25}.

Foi descrito anteriormente que ambos os tipos de exercícios exercem papel fundamental no tratamento e controle do DM2, e a literatura sugere que as respostas fisiológicas agudas e crônicas podem ser observadas em ambos os tipos de exercícios físicos²¹. Entretanto, os efeitos agudos promovidos pelo exercício cardiovascular podem variar de acordo com o volume e intensidade, visto que alguns estudos^{22,26} afirmam que após uma única sessão de exercício aeróbico moderado há um aumento da ação da insulina durante as 24h posteriores ao exercício em portadores do DM2.

Por outro lado, as respostas agudas promovidas pelo exercício neuromuscular em idosos portadores do DM2, ainda não se encontra bem descrita na literatura. Black,

Swan e Alvar²⁷, demonstraram que apenas o exercício neuromuscular, realizado de forma vigorosa, ou seja, a 85 a 90% de uma repetição máxima (1RM), quando comparado ao exercício de intensidade moderada, melhora significativamente a sensibilidade a insulina durante as 24h após a sessão de treino em portadores do DM2, levando em consideração que essa pesquisa foi realizada com adultos jovens com idades entre 18 aos 45 anos, não é possível generalizar tais achados para a população idosa, sendo assim é sugerido que novas pesquisas sejam realizadas já que a maioria das evidências publicadas atualmente utilizam em suas metodologias os exercícios combinados.

O exercício físico realizado a longo prazo (crônico), exerce importante papel no controle e na prevenção das complicações decorrentes do DM2. Após um programa de intervenção física, realizado durante 12 semanas de exercícios combinados, foi observada uma redução da gordura corporal, aumento da massa muscular, redução das taxas glicêmicas consequentemente a melhor atenuação das complicações provenientes do DM2^{28,29}. É sabido que ambos os tipos de exercícios físicos são importantes para a prevenção e controle do DM2, sendo assim Xu *et al.*³⁰, propõem uma possível nova forma de se entender as mudanças fisiológicas provenientes do exercício através dos MicroRNAs circulantes.

Os MicroRNAs, também chamados de miRs, pertencem a uma classe de pequenos RNAs, possuem 18 a 23 nucleotídeos em sua cadeia de filamento único e não são codificadores de proteína³¹. Os miRs estão envolvidos na regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional ao fazer ligação na região 3' ou 5' não traduzidas (UTR) de RNAs mensageiros (mRNAs), podendo causar a inibição da tradução da proteína ou até mesmo causar a degradação do mRNA^{32,33}.

Na espécie humana, os miRs regulam aproximadamente 50% dos genes codificantes de proteínas^{34,35}. Desde sua descoberta são catalogados hoje 28645 entradas representando precursores de miRNAs, expressando 35828 miRNAs maduros em 223 espécies (<http://www.mirbase.org>, acessado dia 05/01/2017)³⁶.

Os miRNAs podem ser encontrados na circulação, em fluídos corporais como: sangue, soro e plasma sanguíneo, urina, dentre outros fluídos, esses são classificados de miRNAs circulantes (c-miRNAs)³⁷. Os c-miRNAs estão associados com as microvesículas (exossomas), e com as lipoproteínas de alta densidade (HDL), essas ligações tornam os miRNAs estáveis e resistentes as atividades das RNases endógenas e também a ciclos repetitivos de congelamento e descongelamento

tornando-se importantes mecanismos para estudos³⁸. É devido a essa característica essencial que os miRNAs podem ser potencialmente classificados como biomarcadores na saúde e na doença³⁹.

Um dos primeiros estudos associar os c-miRNAs à doenças foi realizado por Kosaka, Iguchi e Ochiya⁴⁰, na ocasião foi evidenciado que o miR-21 e o miR-141, estão relacionados respectivamente com o linfoma de grandes células B e com o câncer de próstata, sendo assim esses dois miRs podem ser classificados como tumor-específico e são potencialmente biomarcadores no diagnóstico e prognóstico para esses tipos de câncer. Posteriormente estudos vêm relacionando os miRs com outras doenças, inclusive o DM2⁴¹⁻⁴³.

Evidências apontam uma possível associação dos miRs-126, 146a e 155 com o DM2. O miR-126 está presente de forma abundante nas células endoteliais, e exerce papel importante para a integridade vascular, angiogênese e reparação de feridas⁴⁴. É sugerido por Zhang *et al.*⁴⁵, uma relação do miR-126 com as altas taxas glicêmicas provenientes do DM2, associando a alta concentração de glicose no sangue com a diminuição das concentrações do miR-126. Para os miRs 146a e 155 estudos demonstram uma relação com o estado inflamatório decorrente do DM2⁴⁶⁻⁴⁸, sendo assim os miRs supracitados podem ser considerados como potenciais biomarcadores para o DM2 e foram adotados como objeto de estudo para a presente pesquisa.

Para o presente estudo foi adotada a justificativa de que a compreensão de como intervenções não-farmacológicas, especificamente o exercício físico, modulam a expressão dos c-miRNAs contribui para o entendimento das diferentes formas de adaptações do organismo diabético ao exercício, com a hipótese inicial de que o exercício físico de ambos os tipos (cardiovascular e neuromuscular), promovem respostas agudas sobre as concentrações séricas dos miRs 126, 146a e 155 em idosos portadores do DM2.

2 OBJETIVO

Analisar o efeito agudo de dois tipos de intervenções (cardiovascular e neuromuscular) sobre as concentrações séricas dos miRs 126, 146a e 155 em idosos portadores do Diabetes Mellitus Tipo 2.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo, teve delineamento *quasi-experimental* de corte transversal, visto que a amostra foi submetida a dois tipos de intervenções físicas experimentais (neuromuscular e cardiovascular), que serão descritas posteriormente.

3.1 *Amostra e Critérios de Inclusão/Exclusão*

Participaram do estudo 23 idosos, de ambos os sexos e sedentários, sendo, 13 portadores do DM2 (7 do sexo feminino e 6 do sexo masculino), controlados e 10 não diabéticos (7 do sexo feminino e 3 do sexo masculino), denominados Grupo 1 e 2, respectivamente. Todos os participantes eram acompanhados regularmente em nível de atenção básica pelo sistema municipal de saúde do município de Cedro de São João (SE), sendo esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os critérios de inclusão consistiram em ter idade igual ou superior a 60 anos e não apresentar dificuldade de locomoção que possam comprometer a realização das intervenções. Foram excluídos os voluntários que apresentassem DM2 descompensada à avaliação inicial. O estudo faz parte do projeto “Características sociodemográficas, composição corporal e estilo de vida em idosos participantes de Grupos de Convivência”, aprovado e atualizado sob parecer de número CAAE: 0213.0.107.000-11.

3.2 *Características antropométricas*

Foram determinados o Índice Massa Corporal (IMC; kg/m²), Circunferência de Cintura (CC; cm) e Circunferência de Quadril (CQ; cm) para caracterização antropométrica da amostra, respeitando as padronizações recomendadas pela Organização Mundial da Saúde⁴⁹.

3.3 Delineamento Experimental

O experimento teve a duração de duas semanas. Na primeira, ocorreu a aferição da frequência cardíaca de repouso (FCrep), com o objetivo de estimar a zona de intensidade do esforço e a familiarização das intervenções. Na mesma semana, com intervalo de 72 horas, ocorreu a intervenção 1 (circuito neuromuscular) juntamente com as coletas sanguíneas pré e pós-procedimento. Na segunda semana, com um intervalo de sete dias da realização da intervenção 1, foi realizada a intervenção 2 (caminhada orientada), seguida por novas coletas sanguíneas pré e pós-intervenção (Figura 1).

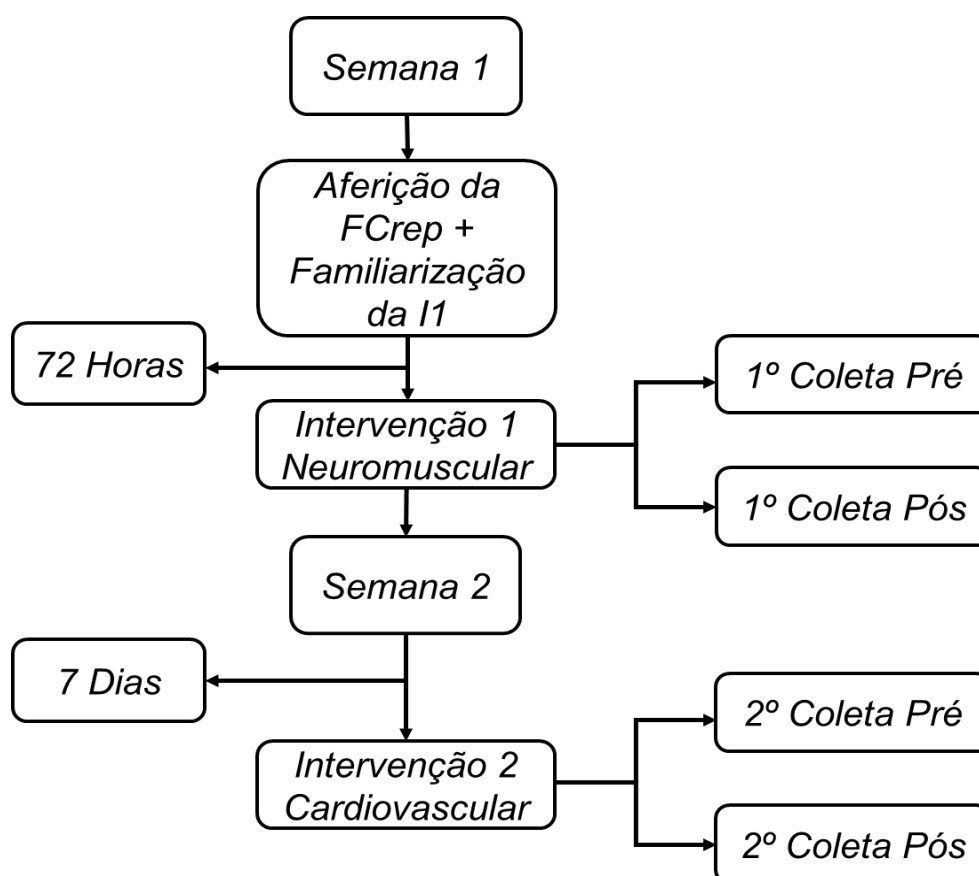


Figura 1: Delineamento experimental do estudo. **FCrep** – Frequência Cardíaca de Repouso; **I1** – Intervenção 1; **Pré** – Pré-Intervenção; **Pós** – Pós-Intervenção.

O controle da intensidade foi feito com o equipamento Polar Team® com software do mesmo fabricante e um dispositivo tablet específico ao propósito. Foi

adotada a faixa de intensidade entre 60 a 70% da FC de reserva (FC_{reserva}), determinada pela equação $FC_{reserva} = FC_{m\acute{a}x} - FC_{rep}$, onde a FC máxima (FC_{máx}) foi estimada pela equação de Karvonen ($FC_{m\acute{a}x} = 220 - Idade$)⁵⁰, enquanto a FC de repouso (FC_{rep}) foi aferida após cinco minutos de total repouso em posição supinada em ambiente arejado a temperatura ambiente.

3.4 *Aquecimento e Volta à Calma*

O aquecimento teve a duração de cinco minutos, e foi composto por exercícios de mobilidade articular, englobando as articulações dos ombros, quadril e joelhos necessárias para a realização das intervenções, com 15 repetições por articulação. A volta à calma teve a duração de cinco minutos consistiu em exercícios respiratórios e de alongamento.

3.5 *Circuito Neuromuscular (Intervenção 1)*

O circuito neuromuscular foi composto por oito estações, contendo exercícios de base fixa e alternados por seguimentos. A presente intervenção possuiu duração média de 40 minutos, distribuídos em três etapas principais, sendo elas: (1) cinco minutos de aquecimento; (2) 30 minutos do circuito e (3) cinco minutos de volta à calma. A coleta sanguínea foi realizada imediatamente após ao término das atividades de volta à calma.

O circuito foi realizado em três passagens, com 40 segundos de realização em cada estação, 20 segundos de descanso entre cada estação e um minuto de descanso por passagem⁵¹. Durante cada descanso, foi colocado um posto para a hidratação dos participantes, totalizando aproximadamente 30 minutos de exercício propriamente dito. A FC foi monitorada continuamente durante toda a intervenção. É importante ressaltar que foi mantido um profissional treinado em cada estação a fim de garantir a segurança dos voluntários.

Os exercícios adotados para cada estação foram: “remada”, realizada com *Theraband*, (Carci, São Paulo, Brasil), tensão extra forte, presas a um estrutura fixa, o voluntário realizava o movimento de remada em pé. “Sentar e Levantar de uma

cadeira” adaptado por Rikli e Jones⁵², consistiu em movimentos repetitivos de sentar e levantar simulando um movimento de agachamento. “Supino vertical”, realizada com *Theraband*, (mesmas especificações adotadas na estação remada). “Agachamento terra” (exercício em que há predominância de movimentos de quadril), foi realizado com o um kettlebell de 10kg para ambos os sexos. “Rosca bíceps”, realizada com halteres (*Polimet*, Curitiba, Brasil) 3kg para homens e 2kg para mulheres⁵². “Agachamento com *Gym Ball*, (*Mercur*, Santa Cruz do Sul, Brasil)” movimentos de agachamento com o auxílio da *Gym Ball*. “Tríceps com halteres” (adotados a mesma carga e especificações que na estação da “rosca bíceps”). “Agachamento livre” (exercício em que há predominância de movimentos de joelho realizados apoiados em um bastão). A ordem do circuito é a mesma que os exercícios foram apresentados respeitando a configuração de alternado por segmento e priorizando os grandes grupos musculares (Figura 2).

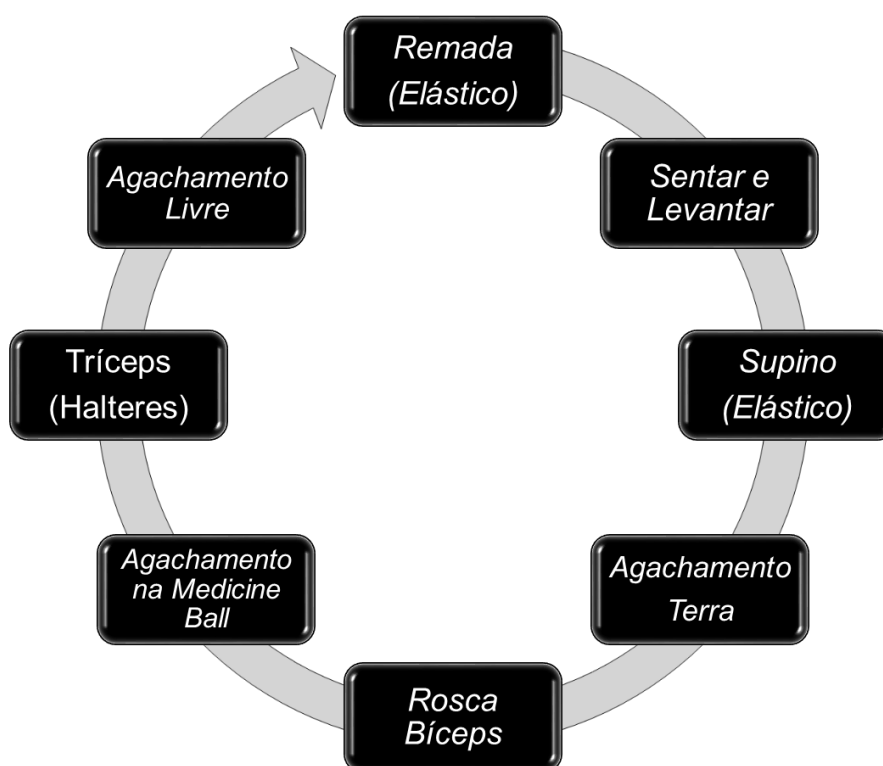


Figura 2: Representação esquemática do Circuito Neuromuscular.

3.6 Caminhada orientada (Intervenção 2)

A segunda intervenção teve a duração de 50 minutos, distribuídos em cinco minutos de aquecimento, 40 minutos de caminhada orientada e cinco minutos de volta à calma. A coleta sanguínea foi realizada após ao término das atividades de volta à calma e a caminhada orientada teve a duração de 40 minutos com zona de intensidade de 60% a 70% da FCreserva calculada previamente⁵³. Para a segurança e hidratação dos voluntários foram adotados o mesmo protocolo proposto na intervenção 1.

3.7 *Procedimento de coleta do sangue*

A coleta foi realizada por punção venosa, utilizando-se os sistemas a vácuo com tubos contendo substância anticoagulante (EDTA). Foram coletados 5 ml de sangue total, imediatamente distribuídos em alíquotas menores (1 ml), e estocadas a -20°C até o momento das análises moleculares. Todas as punções foram realizadas por um profissional da área da Enfermagem, habilitado e com vasta experiência na realização de tais coletas.

3.8 *Extração de RNA total*

Através das alíquotas de sangue previamente armazenadas, foi realizado o processo de purificação do RNA total. Foram feitas através do kit comercial *mirVANA PARIS* fabricado pela *Life Technologies* seguindo o protocolo do fabricante, com modificações, a partir de 0,7 ml de sangue total lentamente descongelado em banho de gelo. Após a extração foi realizada a determinação da quantificação e da qualidade das amostras extraídas usando o equipamento NanoDrop Lite Spectrophotometer (*Thermo Scientific™*). As amostras de RNA total foram armazenadas a -20°C para posteriores análises.

3.9 *Eficiência de Amplificação*

Primeiramente, foram realizadas diluições seriadas de 1:10 com três amostras de diferentes concentrações, uma de menor concentração (35,4 ng/μl), uma de concentração média (56,6 ng/μl) e uma mais concentrada (97 ng/μl), com o objetivo de encontrar a concentração em que a reação de qPCR melhor funcione. Após estes procedimentos, identificou-se melhor eficiência na concentração de 10^{-3} , a qual foi adotada para os três miRNAs (126, 146a e 155).

3.10 Análise por qPCR

A preparação de cDNA de miRs foi realizada usando o sistema TaqMan microRNA Reverse Transcription (RT) kit (*Life Technologies*, Foster City, CA, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. Para quantificação dos miRs sob investigação (miR-126, -146a e -155) por qPCR, foram usadas sondas do sistema TaqMan (Quadro 1), com o reagente Universal PCR Master Mix (*Life Technologies*), seguindo o protocolo do fabricante em sistema Eco™ Real-Time PCR System, versão 4.0 (Illumina® San Diego, CA, USA), com condições de denaturação a 50°C por dois minutos e 95°C por dez minutos seguido por ciclagem a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto por 45 ciclos. Foi adotado como referência (controle endógeno) o RNU43, e as determinações foram realizadas por quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta Ct}$ descrito por Zhang *et al.*⁴⁵. Todas as reações foram realizadas em duplicata, determinando-se o valor médio do limiar de amplificação (CT) de cada amostra, com as amplificações de miRs e endógeno de cada amostra agrupada em uma mesma placa para evitar erros decorrentes de variação entre placas.

Quadro 1: Identificação dos ensaios e das sondas para cada miRNA

Sonda	Ensaio	Identificação
miR-126	Hs00508911_CE	rs746772073
miR-146a	Hs00506373_CE	rs190441722
miR-155	Hs00503923_CE	rs747639762

3.11 Tratamento estatístico

A análise estatística foi composta por valores médios, desvio padrão, intervalo de confiança e frequências para os índices antropométricos e a caracterização do risco cardiovascular da amostra. Foram realizados o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene para a determinação da distribuição normal e da homogeneidade dos dados, respectivamente.

Foi realizado o teste de análise de variância multivariada (MANOVA) para comparação dos valores basais, e a análise de covariância (ANCOVA) para as comparações da magnitude de efeito sobre os níveis dos miRs entre a condição clínica do paciente, foi realizado a diferença entre momentos comparando os deltas (valor no momento pós subtraídos pelo valor no momento pré) entre diabéticos e não-diabéticos, usando como co-variável o valores basais de cada miR, e teste de post hoc de bonferroni para ambas as análises.

Todos os testes foram realizados pelo software *Statistical Package for the Social Sciences* SPSS, Versão 22, para todas as análises foram adotados o nível de significância de $p < 0,05$. O poder estatístico do estudo é 0,65 considerado moderado e foi calculado pelo software GPower versão 3.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo será apresentado o manuscrito submetido à aprovação da revista *Journal of Diabetes and Its Complications* com fator de impacto 2,955 e qualis A2 para a área da Educação Física, que está sob avaliação (Anexo A).

ARTIGO

O EXERCÍCIO FÍSICO NEUROMUSCULAR AGUDO PROMOVE RESPOSTAS NOS NÍVEIS CIRCULANTES DO miR-146a EM IDOSOS COM DIABETES DO TIPO 2

Introdução

O processo de envelhecimento induz a uma série de modificações morfológicas e fisiológicas no corpo humano, tais como diminuição das capacidades funcionais dos órgãos e tecidos, perda da massa muscular e alterações nas capacidades metabólicas². Devido a essas modificações, o risco das doenças cardiometabólicas (DCM) eleva-se⁵, com um maior nível de sedentarismo determinando maior massa corporal e, conseqüentemente, um aumento significativo da incidência de DCM, principalmente o diabetes⁶.

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica e está diretamente associada com a falta de produção e também na deficiência de insulina produzida pelo corpo humano. O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) decorre diretamente de um estado de resistência insulínica onde há menor captação de glicose pelas células em mecanismo mediado por insulina, resultando em uma hiperglicemia sistêmica. Esta condição está diretamente associada à predisposição genética, à inatividade física e aos maus hábitos alimentares^{7,12}.

A principal forma de tratamento consiste em mudanças de hábitos de vida, com adequação da dieta e prática de exercícios físicos regulares. Dentre as formas farmacológicas, fármacos antidiabéticos orais normalmente constituem a terapêutica inicial para redução dos níveis glicêmicos para níveis normais¹⁴.

Há evidências robustas na literatura^{7,15}, sobre como o exercício físico auxilia no controle glicêmico, atuando na melhora a sensibilidade dos tecidos à insulina, na diminuição dos níveis de insulina circulante e na redução do peso corporal. O aumento da captação da glicose sanguínea para os músculos também pode-se dar por mecanismos não dependentes de insulina, ou intensificação da ação dos transportadores de glicose (GLUT4).

A literatura mostra que ambos os tipos de exercícios físicos (cardiorrespiratório e neuromuscular) exercem efeitos positivos na prevenção assim como no controle do DM2⁵⁴, com efeitos fisiológicos agudos e crônicos podendo ser observados a partir de ambos os tipos de exercícios²¹. A literatura vem sugerindo uma nova maneira de compreender a doença e as respostas decorrentes do exercício físico por meio dos MicroRNAs circulantes³⁰.

MicroRNAs (ou miRs) são pequenos RNAs não codificantes de proteínas e possuem de 18 a 23 nucleotídeos em sua cadeia de um único filamento³¹, e que exercem regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional ao fazer ligação nas regiões 3' ou 5' não traduzidas de RNAs mensageiros (mRNAs) alvos. Podem assim causar a inibição da tradução da proteína ou até mesmo a degradação do mRNA^{32,33}.

Apesar de produzidos no núcleo celular, miRs podem estar livres na circulação, podendo ser encontrados no sangue, no soro sanguíneo e em outros fluídos corporais, sendo denominados de miRNAs circulantes (c-miRNAs)³⁷. Os c-miRNAs são estáveis devido a sua associação com as microvesículas (exossomas), e também as lipoproteínas de alta densidade (HDL)³⁸. Essas associações tornam os miRNAs resistentes as atividades das RNases endógenas e também a ciclos repetitivos de congelamento e descongelamento, tornando-se importantes mecanismos para estudos. É devido a essa estabilidade e resistência que miRNAs podem ser potenciais biomarcadores para condições de saúde ou de doença³⁹.

Estudos recentes vêm sugerindo a associação desses miRNAs com diversas doenças, inclusive o DM2^{41,42}. A literatura vem mostrando uma relação inversamente proporcional da taxa de glicemia com a concentração do miR-126 no sangue, quanto maior a taxa glicêmica menor será a concentração desse miR no sangue^{43,45}. Achados recentes mostram que concentrações reduzidas do miR-146a e miR-155 acarreta em um estado pró-inflamatório decorrente do DM2⁴⁶⁻⁴⁸. Sendo assim ambos os três miRs

supracitados tem uma possível relação com o DM2, por esses motivos no presente estudo foram adotados esses três miRs.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo consistiu em analisar o efeito agudo de dois tipos de intervenções (cardiovascular e neuromuscular) sobre as concentrações circulantes totais dos miRs 126, 146a e 155 em idosos portadores do Diabetes Mellitus Tipo 2. O presente estudo se justificava pelo fato de que, enquanto potenciais biomarcadores para DM2, a compreensão sobre como intervenções físicas modulam a expressão destas moléculas sistemicamente pode contribuir para o entendimento das diferentes formas de adaptações do organismo diabético ao exercício.

MÉTODOS

O presente estudo, teve delineamento *quasi-experimental* de corte transversal, visto que a amostra foi submetida a dois tipos de intervenções físicas experimentais (neuromuscular e cardiovascular), que serão descritas posteriormente.

Amostra

Participaram do estudo 23 idosos, de ambos os sexos e sedentários, sendo, 13 portadores do DM2 (7 do sexo feminino e 6 do sexo masculino), controlados e 10 não diabéticos (7 do sexo feminino e 3 do sexo masculino), denominados Grupo 1 e 2, respectivamente. Todos os participantes eram acompanhados regularmente em nível de atenção básica pelo sistema municipal de saúde de Cedro de São João (SE), sendo esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os critérios de inclusão consistiram em ter idade igual ou superior a 60 anos e não apresentar dificuldade de locomoção que possam comprometer a realização das intervenções. Foram excluídos os voluntários que apresentassem DM2 descompensada à avaliação inicial. O estudo faz parte do projeto “Características sociodemográficas, composição corporal e estilo de vida em idosos participantes de Grupos de Convivência”, aprovado e atualizado sob parecer de número CAAE: 0213.0.107.000-11.

Características antropométricas

Foram determinados o Índice Massa Corporal (IMC; kg/m^2), Circunferência de Cintura (CC; cm) e Circunferência de Quadril (CQ; cm) para caracterização antropométrica da amostra, respeitando as padronizações recomendadas pela Organização Mundial da Saúde⁴⁹.

Delineamento Experimental

O experimento teve a duração de duas semanas. Na primeira, ocorreu a aferição da frequência cardíaca de repouso (FCrep), com o objetivo de estimar a zona de intensidade do esforço e a familiarização das intervenções. Na mesma semana, com intervalo de 72 horas, ocorreu a intervenção 1 (circuito neuromuscular) juntamente com as coletas sanguíneas pré- e pós-procedimento. Na segunda semana, com um intervalo de sete dias da realização da intervenção 1, foi realizada a intervenção 2 (caminhada orientada), seguida por novas coletas sanguíneas pré e pós- intervenção (Figura 1).

O controle da intensidade foi feito com o equipamento Polar Team® com software do mesmo fabricante e um dispositivo tablet específico ao propósito. Foi adotada a faixa de intensidade entre 60% a 70% da frequência cardíaca de reserva (FCreserva), determinada pela equação $FC_{\text{reserva}} = FC_{\text{máx}} - FC_{\text{rep}}$, onde a FC máxima (FCmáx) foi estimada pela equação de Karvonen ($FC_{\text{máx}} = 220 - \text{Idade}$)⁵⁰, enquanto a FC de repouso (FCrep) foi aferida após cinco minutos de total repouso em posição supinada em ambiente arejado a temperatura ambiente.

Aquecimento e Volta à Calma

O aquecimento teve a duração de cinco minutos, e foi composto por exercícios de mobilidade articular, englobando as articulações dos ombros, quadril e joelhos necessárias para a realização das intervenções, com 15 repetições por articulação. A volta à calma teve a duração de cinco minutos consistiu em exercícios respiratórios e de alongamento.

Circuito Neuromuscular (Intervenção 1)

O circuito neuromuscular foi composto por oito estações com exercícios de base fixa com o formato alternado por seguimento, tendo duração de 40 minutos distribuídos em cinco minutos de aquecimento, 30 minutos do circuito e cinco minutos de volta à calma, sendo que a coleta sanguínea foi realizada após o término das atividades de volta à calma.

O circuito foi realizado em três passagens com 40 segundos de realização em cada estação, 20 segundos de descanso por estação e um minuto de descanso por passagem⁵¹. Durante cada descanso, foi colocado um posto para a hidratação dos participantes, totalizando aproximadamente 30 minutos do circuito. A frequência cardíaca foi monitorada continuamente durante a execução do circuito, foi mantido um profissional treinado a cada estação para garantir a segurança dos voluntários.

Os exercícios adotados para cada estação foram: “remada”, realizada com *Theraband*, (*Carci*, São Paulo, Brasil), tensão extra forte, presas a um estrutura fixa, “sentar e levantar de uma cadeira” adaptado por Rikli e Jones⁵², “supino vertical”, realizada com *Theraband*, (mesmas especificações adotadas na estação remada), “agachamento terra” (exercício em que há predominância de movimentos de quadril), “rosca bíceps”, realizada com halteres (*Polimet*, Curitiba, Brasil) 3kg para homens e 2kg para mulheres⁵², “agachamento com *Gym Ball*, (*Mercur*, Santa Cruz do Sul, Brasil)”, “tríceps com halteres” (adotados a mesma carga e especificações que na estação da “rosca bíceps”), “agachamento livre” (exercício em que há predominância de movimentos de joelho realizados apoiados em um bastão). A ordem do circuito é a mesma que os exercícios foram apresentados respeitando a configuração de alternado por segmento e priorizando os grandes grupos musculares (Figura 2).

Caminhada orientada (Intervenção 2)

A segunda intervenção (caminhada orientada) teve a duração de 50 minutos, distribuídos em cinco minutos de aquecimento, 40 minutos de caminhada orientada e cinco minutos de volta à calma. A coleta sanguínea foi realizada após o término das atividades de volta a calma e a caminhada orientada teve a duração de 40 minutos

com zona de intensidade de 60% a 70% da FCreserva calculada previamente⁵³. Para a segurança e hidratação dos voluntários foram adotados o mesmo protocolo proposto na intervenção 1.

Procedimento de coleta do sangue

A coleta foi realizada por punção venosa, utilizando-se os sistemas a vácuo com tubos contendo substância anticoagulante (EDTA). Foram coletados 5 ml de sangue total, imediatamente distribuídos em alíquotas menores (1 ml), e estocadas a -20°C até o momento das análises moleculares. Todas as punções foram realizadas por um profissional da área da Enfermagem, habilitado e com vasta experiência na realização de tais coletas.

Extração de RNA total

Através das alíquotas de sangue armazenadas, foi realizado o processo de purificação do RNA total. Foram feitas através do kit comercial *mirVANA PARIS* fabricado pela *Life Technologies* seguindo o protocolo do fabricante, com modificações, a partir de 0,7 ml de sangue total lentamente descongelado em banho de gelo. Após a extração foi realizada a determinação da quantificação e da qualidade das amostras extraídas usando o equipamento NanoDrop Lite Spectrophotometer (*Thermo Scientific™*). As amostras de RNA total foram armazenadas a -20°C para posteriores análises.

Eficiência de Amplificação

Primeiramente, foram realizadas diluições seriadas de 1:10 com três amostras de diferentes concentrações, uma de menor concentração (35,4 ng/μl), uma de concentração média (56,6 ng/μl) e uma mais concentrada (97 ng/μl), com o objetivo de encontrar a concentração em que a reação de qPCR melhor funcione. Após estes

procedimentos, identificou-se melhor eficiência na concentração de 10^{-3} , a qual foi adotada para os três miRNAs (126, 146a e 155).

Análise por qPCR

A preparação de cDNA de miRs foi realizada usando o sistema TaqMan microRNA Reverse Transcription (RT) kit (*Life Technologies*, Foster City, CA, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. Para quantificação dos miRs sob investigação (miR-126, -146a e -155) por qPCR, foram usadas sondas do sistema TaqMan (Quadro 1) com o reagente Universal PCR Master Mix (*Life Technologies*), seguindo o protocolo do fabricante em sistema Eco™ Real-Time PCR System, versão 4.0 (Illumina® San Diego, CA, USA), com condições de denaturação a 50°C por dois minutos e 95°C por dez minutos seguido por ciclagem a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto por 45 ciclos. Foi adotado como referência (controle endógeno) o RNU43, e as determinações foram realizadas por quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta Ct}$ descrito por Zhang *et al.*⁴⁵. Todas as reações foram realizadas em duplicata, determinando-se o valor médio do limiar de amplificação (CT) de cada amostra, com as amplificações de miRs e endógeno de cada amostra agrupada em uma mesma placa para evitar erros decorrentes de variação entre placas.

Tratamento estatístico

A análise estatística foi composta por valores médios, desvio padrão, intervalo de confiança e frequências para os índices antropométricos e a caracterização do risco cardiovascular da amostra. Foram realizados o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene para a determinação da distribuição normal e da homogeneidade dos dados, respectivamente.

Foi realizado o teste de análise de variância multivariada (MANOVA) para comparação dos valores basais e a análise de covariância (ANCOVA) para as comparações da magnitude de efeito sobre os níveis dos miRs entre a condição clínica do paciente, foi realizado a diferença entre momentos comparando os deltas (valor no momento pós subtraídos pelo valor no momento pré) entre diabéticos e não-

diabéticos, usando como co-variável os valores basais de cada miR, e teste de post hoc de bonferroni para ambas as análises.

Todos os testes foram realizados pelo software IBM SPSS Statistics Versão 22, para todas as análises foram adotados o nível de significância de $p < 0,05$. O poder estatístico do estudo é 0,65 considerado moderado e foi calculado pelo software GPower versão 3.1.

RESULTADOS

Para a Intervenção I (Neuromuscular), participaram todos os 23 idosos supracitados, enquanto para a Intervenção II (Cardiovascular), houve uma perda amostral por motivos de saúde, de 3 participantes (2 portadores do DM2, ambos os sexos, e 1 assintomático, do sexo feminino). As características antropométricas conforme grupos (diabéticos e não diabéticos) estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Características antropométricas da amostra

Característica	Diabéticos			Não Diabéticos		
	Média	DP	IC	Média	DP	IC
Idade (Anos)	68,23	± 5,31	65,02 - 71,43	67,45	± 4,91	64,15 - 70,75
MC (kg)	69,19	± 14,86	60,21 - 78,17	67,45	± 9,41	61,12 - 73,78
Estatura (m)	1,55	± 0,07	1,51 - 1,60	1,56	± 0,09	1,50 - 1,62
IMC (kg/m ²)	28,52	± 5,88	24,96 - 32,08	27,54	± 2,92	25,58 - 29,50
CC (cm)	99,77	± 10,38	93,49 - 106,05	95,36	± 7,20	90,52 - 100,20
CQ (cm)	101,92	± 9,87	95,96 - 107,88	100,18	± 6,22	95,99 - 104,36

Legenda: MC - Massa corporal; IMC - Índice massa corporal; CC - Circunferência cintura; CQ - Circunferência de quadril.

As figuras 1A e 1B (Figura 3) apresentam as comparações dos valores basais (momento pré) entre grupos. A figura 1A (Intervenção 1) e 1B (Intervenção 2) apresentam as comparações das quantidades relativas dos três miRs entre os grupos, não havendo diferenças significativas em suas concentrações circulantes totais conforme condição clínica vigente ou protocolo de treinamento a ser implementado.

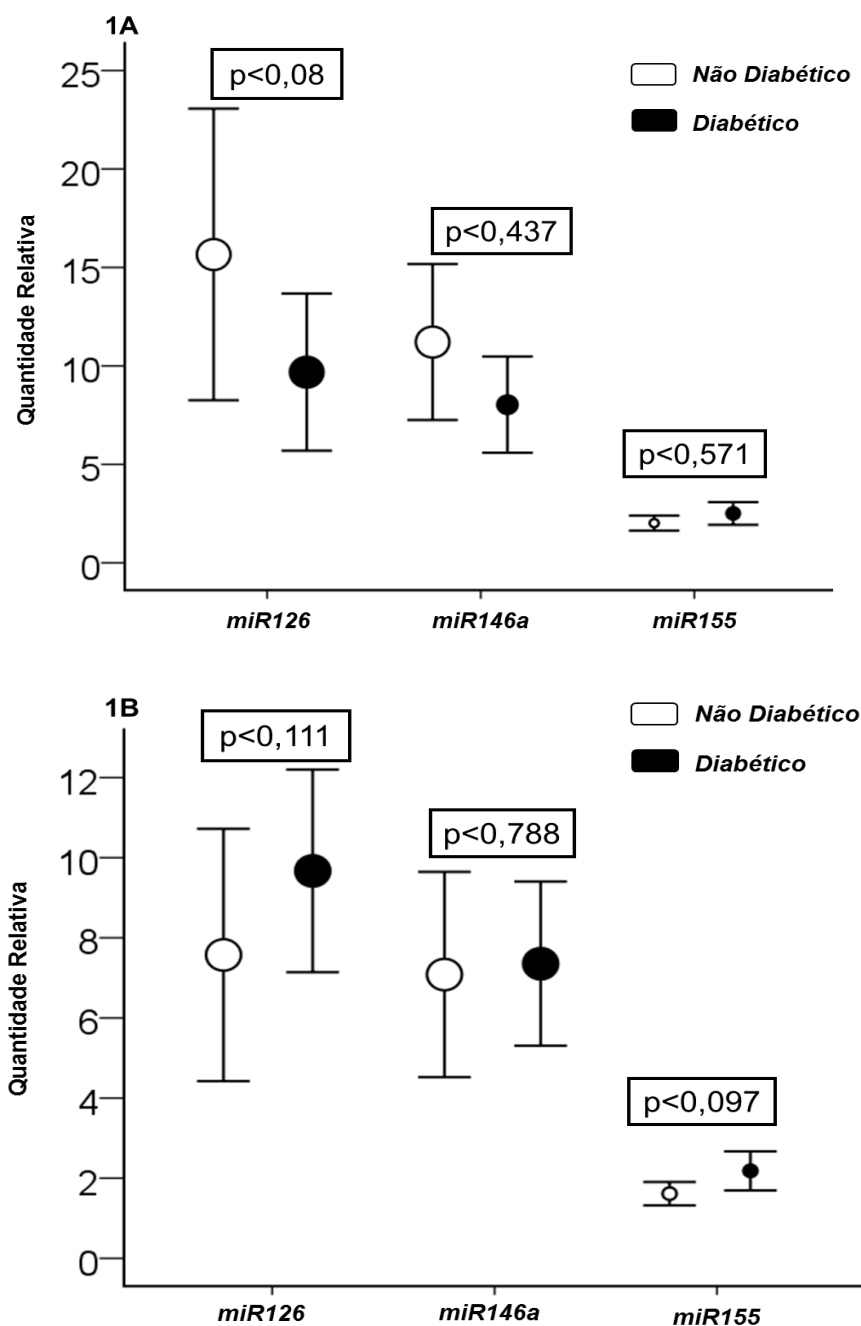


Figura 3: Comparações dos valores basais entre os grupos: Intervenção 1(1A) e Intervenção 2(1B), apresentados com o erro padrão (EP).

As figuras 2A e 2B (Figura 4) apresentam as comparações da magnitude do efeito frente as duas intervenções entre os grupos. A co-variável está significativamente relacionada com a magnitude do efeito do miR-146a frente a intervenção neuromuscular $F(1, 23) = 166,31$; $p < 0,001$. Também houve um significativo efeito nos níveis circulantes do miR-146a em face de o paciente ser ou

não diabético com elevações substancialmente maiores que os incrementos exibidos pelo os não diabéticos, frente a intervenção 1, verificando-se $F(2, 23) = 54,33$; $p < 0,001$. Nenhuma alteração pôde ser observada nos níveis circulantes de quaisquer dos três miRs estudados frente a intervenção 2.

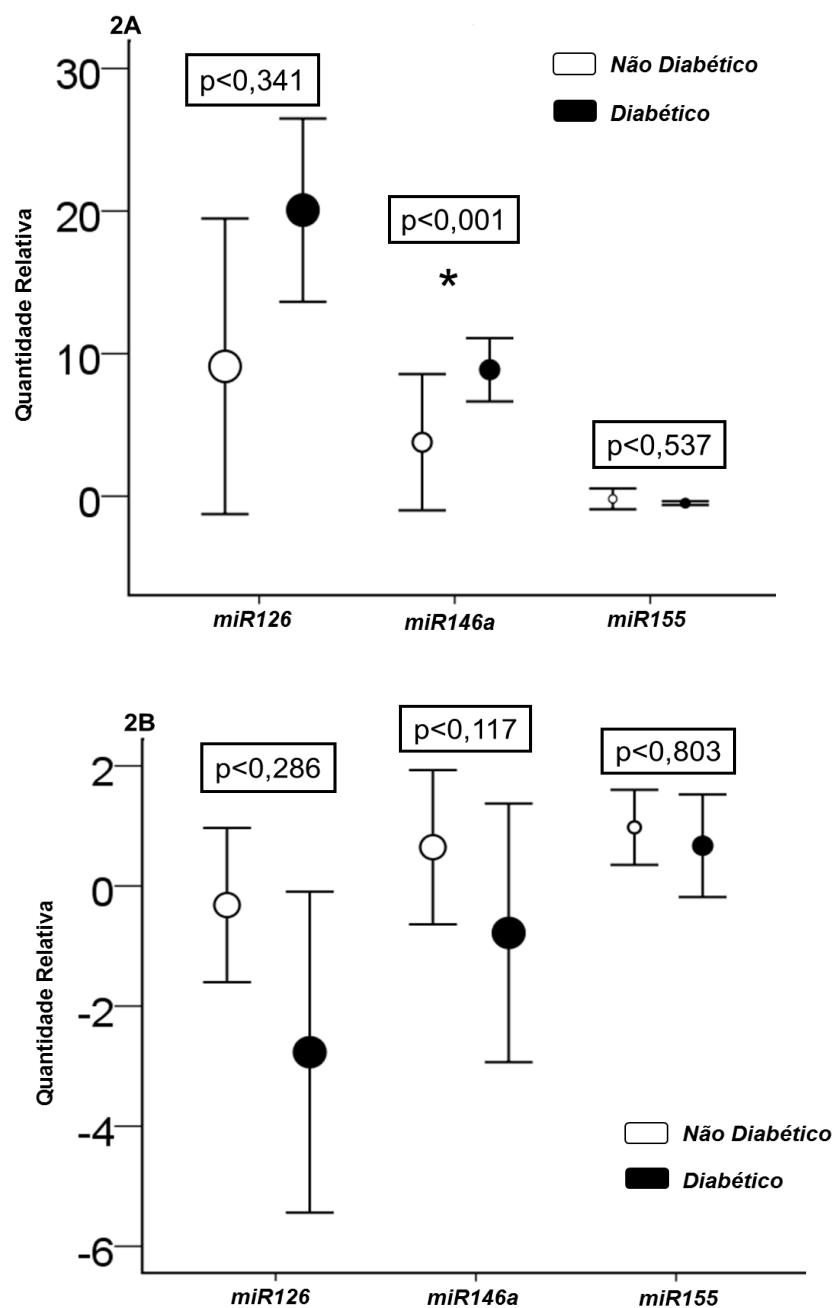


Figura 4: Comparações da magnitude do efeito (Δ =Pós-Pré) frente as intervenções, entre os grupos: Intervenção 1(2A) e Intervenção 2(2B), apresentados com o erro padrão (EP). * $p < 0,001$ (miR-146a frente a intervenção 1).

DISCUSSÃO

O principal resultado obtido com o presente estudo consistiu na alteração dos níveis circulantes totais do miR-146a frente à intervenção neuromuscular, com alterações significativamente maiores em magnitude para os diabéticos quando comparado com aquela observada em sujeitos assintomáticos. Em vista de que os parâmetros clínicos e níveis do microRNAs investigados apresentavam-se comparáveis entre pacientes diabéticos e não-diabéticos no momento inicial (baseline) e que as variações produzidas foram corrigidas para os valores basais de cada miR, nossos resultados aparentam apontar para um fenômeno consistente e intervenção-específico, por não se reproduzir frente à intervenção cardiovascular ou se estender para as demais formas de microRNAs investigadas.

Até o presente momento, os autores desconhecem outro trabalho que se propôs a analisar simultaneamente o efeito agudo de dois tipos de intervenções (cardiovascular e neuromuscular) sobre as concentrações circulantes totais de microRNAs em idosos portadores ou não de Diabetes Mellitus Tipo 2.

Os microRNAs são liberados na circulação durante a prática de exercício físico, e são considerados mediadores dos processos adaptativos provenientes do esforço, como: a hipertrofia muscular, durante a geração de força contráctil e decorrentes dos processos inflamatórios⁵⁵. O entendimento de como o exercício físico promove respostas fisiológicas agudas na expressão dos miRNAs no organismo dos indivíduos doentes, pode ajudar a desenvolver potenciais formas terapêuticas para conter os agravos das doenças³⁰.

Os mecanismos envolvidos na expressão do miR-146a ainda não estão bem descritos na literatura, mas estudos apontam para concentrações reduzidas desse miR na circulação de indivíduos diabéticos^{46,56}, em uma relação inversamente proporcional com a glicemia sérica, com resistência à insulina e com citocinas inflamatórias em portadores do DM2. Balasubramanyam *et al.*⁵⁶, por exemplo, descrevem que a expressão do miR-146a em leucócitos periféricos apresenta-se negativamente associada a um estado de resistência à insulina. Neste sentido, o significativo aumento das concentrações do miR-146a frente à intervenção

neuromuscular podem figurar como aspecto fisiológico sugestivo de regularização do funcionamento do metabolismo glicêmico do organismo^{12,17,18,20, 22, 23,29}.

Foi sugerido ainda por Balasubramanyam *et al.*⁵⁶, que futuros estudos busquem estratégias para aumentar a expressão do miR-146a, enquanto mecanismo para elevação da sensibilidade à insulina. Sendo assim, e com base nos achados aqui evidenciados, fica sugerido uma possível nova rota metabólica promovida pela prática de exercícios físicos para promover benefícios frente às complicações provenientes do DM2. Ademais, Baldeón *et al.*⁴⁶, sugerem que concentrações reduzidas do miR-146a se relacionam a um estado pró-inflamatório associado à hiperglicemia do DM2. Apesar de o presente estudo não explorar os perfis inflamatórios dos sujeitos, podemos sugerir que o exercício neuromuscular, quando realizado em forma de circuito, seria capaz de reduzir as taxas inflamatórias dos portadores do DM2, em linha com o significativo aumento das concentrações do miR-146a observado nos grupos.

Em se tratando do exercício cardiovascular, respostas agudas foram observadas em alguns estudos. Wahl *et al.*⁵⁷, evidenciaram significativos aumentos da concentração do miR-126 pós-exercício com dois protocolos diferentes de exercício cardiovascular. Baggish *et al.*⁵⁵, relataram alterações no miR-146a, após a realização de exercício cardiovascular realizado de forma prolongada. Tais resultados quando comparado com os resultados aqui evidenciados podem justificar a não alteração das concentrações desses dois miRs no presente estudo, visto que em ambos os estudos os autores adotaram intensidades submáximas a máximas e com durações maiores, sugerindo que a intensidade e duração do protocolo de exercício cardiovascular aqui proposto, talvez não foi suficiente para promover respostas agudas para esses dois miRs.

Em contrapartida, no estudo realizado por Mooren *et al.*⁵⁸, evidenciaram que o miR-155 não sofreu alterações após a realização de um protocolo de exercício cardiovascular realizado em um cicloergômetro. Estes resultados corroboram os achados aqui evidenciados, sugerindo que mais estudos sejam realizados para que de fato possa ficar claro o papel do miR-155 no exercício cardiovascular como forma terapêutica para a doença. Vale ressaltar que os estudos supracitados foram realizados com adultos saudáveis, diferenciando do presente estudo. Ficando como sugestão mais pesquisas que adotem a prática de exercício físico com idosos em condições de doença.

É importante ressaltar as possíveis limitações do atual estudo. Em primeiro lugar, é necessário reconhecer que a intervenção se deu por curta duração e em amostra limitada. Seria desejável sua reprodução em outros grupos populacionais e por maior extensão de tempo para se confirmar que os achados aqui encontrados são extensíveis e duradouros, nesta ordem. Assim, sugere-se que futuros estudos que abordem essa temática busquem grupos diversificados assim como maiores duração e tamanho amostral, se possível. E seria prudente a observação continuada dos grupos experimentais de controle (sem exercício) para ser possível excluir que variações nos biomarcadores estudados sejam decorrentes de fatores alheios à intervenção.

Também vale ressaltar que a adoção do sangue como tecido-modelo para estudos que envolvam os c-miRNAs mostra-se de grande valia, visto que o sangue ainda figura como principal material biológico para a mensuração de biomarcadores, devido a sua praticidade de manuseio e ao baixo desconforto imposto aos voluntários, sugerindo que mais pesquisas usem de sangue total para quantificação de miRs enquanto potenciais biomarcadores.

Fica aqui como sugestão, a realização de novos estudos abordando essa temática, para que se possa ter um melhor entendimento do papel dos miRNAs como possíveis marcadores biológicos para o DM2, e também ter uma maior compreensão de como respostas agudas/crônicas do exercício físico, pode exercer variações nas concentrações dessas moléculas no sangue, e assim se ter um melhor entendimento dos benefícios do exercício físico nos diabéticos.

5 CONCLUSÕES

A intervenção neuromuscular, quando realizada em forma de circuito, altera os níveis circulantes totais do miR-146a, com elevações significativamente maiores entre diabéticos quando comparado com a variação observada em sujeitos controle. Nenhuma alteração foi observada nos níveis circulantes dos miRs-126, -146a, -155 com a intervenção cardiovascular, que em condição de saúde ou doença.

Com os resultados do presente estudo é possível adotar novas perspectivas para a prescrição de exercício físico para idosos com o diabetes do tipo 2, visto que o exercício neuromuscular, quando realizado em forma de circuito, parece promover respostas agudas mais satisfatórias para sujeitos idosos em condição de diabetes mellitus tipo 2.

6 REFERÊNCIAS

1. Sarotar NB, Lainscak M. Psychocardiology in the elderly; *Wien Klin Wochenschr* 2016 Dec;22(16):474-79.
2. Chang M, Chen H. Body Composition Outcomes of a Qigong Intervention Among Aging Adults; *West J Nurs Res* 2016 Dec;38(193):1574–94.
3. Tchkonja T, Morbeck DE, Zglinicki T, Deursen J, Lustgarten J, Scrable H, et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence; *Aging Cell* 2010 Oct;9(5):667–84.
4. Cadore EL, Rodríguez-Mañas L, Sinclair A, Izquierdo M. Effects of Different Exercise Interventions on risk of falls, gait ability and balance in physically frail older adults: A systematic review; *Rejuvenation Res* 2013 Apr;16(2):105–14.
5. Garg PK, Koh JH, Delaney JA, Halm A, Hirsch CH, Longstreth Jr WT, et al. Risk Factors for Incident Carotid Artery Revascularization among Older Adults: The Cardiovascular Health Study; *Cerebrovasc Dis Extra* 2016 Dec;6(3):129–39.
6. Brostow DP, Hirsch AT, Pereira MA, Bliss RL, Mindy S. Nutritional status and body composition in patients with peripheral arterial disease: A cross-sectional examination of disease severity and quality of life. *Ecol Food Nutr* 2016 Dec;55(1):87–109.
7. Lenasi H, Klonizakis M. Assessing the evidence: Exploring the effects of exercise on diabetic microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2016 Oct; Vol. Preprint, No. Preprint:1-16.
8. Budoff MJ, Raggi P, Beller GA, Berman DS, Druz RS, Malik S, et al. Noninvasive Cardiovascular Risk Assessment of the Asymptomatic Diabetic Patient: The Imaging Council of The American College of Cardiology. *JACC Cardiovasc Imaging* 2016 Feb;9(2):176–92.
9. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004 May;27(5):1047–53.
10. Pinto B, Rizzato SS, Sampaio PC, Landmann CS, Carvalho DM, Oliveria H, et al. Prevalência de diabetes autorreferido no Brasil: Resultados da Pesquisa Nacional de Saúde 2013. *Epidemiol Serv Saúde* 2015 Jun;24(2):305–14.

11. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2014 Jan;37(Suppl 1):81–90.
12. Röhling M, Herder C, Stemper T, Müssig K. Influence of Acute and Chronic Exercise on Glucose Uptake. *J Diabetes Res* 2016 Mar;2016:2868652:33.
13. Ackermann RT, Cheng YJ, Williamson DF, Gregg EW. Identifying Adults at High Risk for Diabetes and Cardiovascular Disease Using Hemoglobin A1c: National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *Am J Prev Med* 2011 Jan;40(1):11–7.
14. Del Prato S, Barnett AH, Huisman H, Neubacher D, Woerle HJ, Dugi KA. Effect of linagliptin monotherapy on glycaemic control and markers of β -cell function in patients with inadequately controlled type 2 diabetes a randomized controlled trial. *Diabetes, Obes Metab* 2011 Jan;13(3):258–67.
15. Cloostermans L, Wendel-Vos W, Doornbos G, Howard B, Craig CL, Kivimäki M, et al. Independent and combined effects of physical activity and body mass index on the development of Type 2 Diabetes— A meta-analysis of 9 prospective cohort studies. *Int J Behav Nutr Phys Act* 2015 Dec;12(147):1–11
16. Way KL, Hackett DA, Baker MK, Johnson NA. The Effect of Regular Exercise on Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analyses. *Diabetes Metab J* 2016 Aug;40(4):253–71.
17. Umpierre D, Ribeiro PA, Kramer CK, Leitão CB, Zucatti At, Azevedo MJ, et al. Physical Activity Advice Only or Structured exercise training and association with HbA1c Levels in Type 2 Diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2011 May;305(17):1790–9.
18. Yalamanchi SV, Stewart KJ, Ji N, Golden SH, Dobs A, Becker DM, et al. The Relationship of Fasting Hyperglycemia to Changes In Fat and Muscle Mass After Exercise Training in Type 2 Diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2016 Dec;122:154–61.
19. Kalyani RR, Metter EJ, Egan J, Golden SH, Ferrucci L. Hyperglycemia Predicts Persistently Lower Muscle Strength With Aging. *Diabetes Care* 2015 Jan;38(1):82–90.

20. Sigal RJ, Armstrong MJ, Colby P, Alice YY, Booth MD, Goldenberg MD, et al. Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada: physical activity and diabetes. *Can J Diabetes* 2013 Apr;37(1):40–4.
21. Mcgarrah RW, Slentz CA, Kraus WE. The Effect of Vigorous- Versus Moderate-Intensity Aerobic Exercise on Insulin Action. *Curr Cardiol Rep* 2016 Oct;18(117):10–5
22. Jakobsen I, Solomon TPJ, Karstoft K. The Acute Effects of Interval-Type Exercise on Glycemic Control in Type 2 Diabetes Subjects: Importance of Interval Length . A Controlled, Counterbalanced, Crossover Study. *PLoS One* 2016 Oct;11(10):1–15.
23. Liubaoerjijin Y, Terada T, Fletcher K, Boule NG. Effect of aerobic exercise intensity on glycemic control in type 2 diabetes : a meta-analysis of head-to-head randomized trials. *Acta Diabetol* 2016 Oct;53(5):769–81.
24. Irvine C, Taylor NF. Progressive resistance exercise improves glycaemic control in people with type 2 diabetes mellitus : a systematic review. *Aust J Physiother* 2009 Apr;55(4):237–46.
25. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2015-2016. 2016. 1-348 p.
26. Karstoft K, Christensen CS, Pedersen BK, Solomon TP. The acute effects of interval- Vs continuous-walking exercise on glycemic control in subjects with type 2 diabetes: a crossover, controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 2014 Sep;99(9):3334–42.
27. Black LE, Swan PD, Alvar BA. Effects of Intensity and Volume on Insulin Sensitivity During Acute Bouts of Resistance Training. *J Strength Cond Res* 2010 Apr;24(4):1109–16.
28. Kang SJ, Ko KJ, Baek UH. Effects of 12 weeks combined aerobic and resistance exercise on heart rate variability in type 2 diabetes mellitus patients. *J Phys Ther Sci* 2016 Jul;28(7):2088–93.
29. Park JH; Lee YE. Effects of exercise on glycemic control in type 2 diabetes mellitus in Koreans: the fifth Korea National Health and Nutrition Examination

- Survey (KNHANES V). *J Phys Ther Sci* 2015 Nov;27(11):3559–64.
30. Xu T, Liu Q, Yao J, Dai Y, Wang H, Xiao J. Circulating microRNAs in response to exercise. *Scand J Med Sci Sports* 2015 Apr;25(2):149-54.
 31. Endo KE, Weng H, Naito Y, Sasaoka T, Takahashi A, Fukushima Y, et al. Classification of various muscular tissues using miRNA profiling. *Biomed Res* 2013 Dec;34(6):289–99.
 32. Koutsoulidou A, Mastroyiannopoulos NP, Furling D, Uney JB, Phylactou LA. Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle. *BMC Dev Biol* 2011 Jun;11(1):34.
 33. Butz H, Kinga N, Racz K, Patocs A. Circulating miRNAs as biomarkers for endocrine disorders. *J Endocrinol Invest* 2016 Jan;39(1):1-10.
 34. Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res* 2012 Sep;22(1):107–26.
 35. Zhou R, Xiaoqing L, Guoku H, Ai-Yu G, Drescher KM, Chen XM. miR-16 Targets Transcriptional Corepressor SMRT and Modulates NF-kappaB-Regulated Transactivation of Interleukin-8 Gene. *PLoS One* 2012 Jan;7(1):e30772.
 36. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014 Jan;42(Database issue):68–73.
 37. Monleau M, Bonnel S, Gostan T, Blanchard D, Courgnaud V, Lecellier CH. Comparison of different extraction techniques to profile microRNAs from human sera and peripheral blood mononuclear cells. *BMC Genomics* 2014 May;15:1–11.
 38. Wardle SL, Bailey MES, Kilikevicius A, Malkova D, Wilson RH, Venckunas T, et al. Plasma MicroRNA Levels Differ between Endurance and Strength Athletes. *PLoS One* 2015 Apr;10(4):1–15.
 39. Tiberio P, Callari M, Angeloni V, Daidone MG, Appierto V. Challenges in Using Circulating miRNAs as Cancer Biomarkers. *Biomed Res Int* 2015 Aug;2015(731479):10.

40. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: A new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* Oct 2010;101(10):2087–92.
41. Al-Kafaji G, Al-Mahroos G, Alsayed NA, Hasan ZA, Nawaz S, Bakhiet M. Peripheral blood microRNA-15a is a potential biomarker for type 2 diabetes mellitus and pre-diabetes. *Mol Med Rep* 2015 Oct;12(5):7485–90.
42. Yang TT, Song SJ, Xue HB, Shi DF, Liu CM, Liu H. Regulatory T cells in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus retinopathy by miR-155. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015 Nov;10(11):2010–5.
43. Zhang T, Lv C, Li L, Chen S, Liu S, Wang C, et al. Plasma miR-126 Is a Potential Biomarker for Early Prediction of Type 2 Diabetes Mellitus in Susceptible Individuals. *Biomed Res Int* 2013 Dec;2013(761617):6.
44. Liu Y, Gao G, Yang C, Zhou K, Shen B, Liang H, et al. The Role of Circulating MicroRNA-126 (miR-126): A Novel Biomarker for Screening Prediabetes and Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* 2014 Jun;15(6):10567–77.
45. Zhang T, Li L, Shang Q, ChunFang LV, Wang C, Su B. Circulating miR-126 is a potential biomarker to predict the onset of type 2 diabetes mellitus in susceptible individuals. *Biochem Biophys Res Commun* 2015 Jul;463(1–2):60–3.
46. Baldeón L, Weigelt K, de Wit H, Ozcan B, van Oudenaren A, Sempértegui F, et al. Decreased Serum Level of miR-146a as Sign of Chronic Inflammation in Type 2 Diabetic Patients. *PLoS One* 2014 Dec;9(12):1–16.
47. Mazloom H, Alizadeh S, Pasalar P, Nasli EE, Meshkani R. Downregulated microRNA-155 expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetic patients is not correlated with increased inflammatory cytokine production. *Cytokine* 2015 Dec;76(2):403–8.
48. Corral-Fernández NE, Salgado-Bustamante M, Martínez-Leija ME, Cortez-Espinosa N, García-Hernández MH, Reynaga-Hernández E, et al. Dysregulated miR-155 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Type 2 Diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2013 Apr;121(6):347–53.

49. World Health Organization. Physical Status: The use and interpretation of anthropometry. In: Report of a WHO Expert Committee. Geneva, Switzerland; 1995. p. 1–463.
50. Karvonen MJ, Kentala E, Mustala O. The effects of on heart rate. A “longitudinal” study. *Ann Med Exp Biol Fenn.* 1957;35(3):307–15.
51. Romero-Arenas S, Martínez-Pascual M, Alcaraz PE. Impact of Resistance Circuit Training on Neuromuscular, Cardiorespiratory and Body Composition Adaptations in the Elderly. *Aging Dis* 2013 Oct;4(5):256–63.
52. Rikli RE, Jones CJ. Development and Validation of Criterion-Referenced Clinically Relevant Fitness Standards for Maintaining Physical Independence in Later Years. *The Gerontologist* 2013 May;53(2):255–67.
53. World Health Organization. Global recommendations on physical activity for health. Geneva, Switzerland; 2010. p. 1–58.
54. Bassi D, Mendes RG, Arakelian VM, Cristina F, Cabiddu R, Bonjorno Júnior JC, et al. Potential Effects on Cardiorespiratory and Metabolic Status After a Concurrent Strength and Endurance Training Program in Diabetes Patients - a Randomized Controlled Trial. *Sport Med-Open* 2016 Dec;31(2):1–13.
55. Baggish AL, Park J, Min PK, Isaacs S, Parker BA, Thompson PD, et al. Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. *J Appl Physiol* 2014 Mar;116(5):522–31.
56. Balasubramanyam M, Aravind S, Gokulakrishnan K, Prabu P, Sathishkumar C, Ranjani H, et al. Impaired miR-146a expression links subclinical inflammation and insulin resistance in Type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem* 2011 May;351(1-2):197–205.
57. Wahl P, Wehmeier UF, Jansen FJ, Kilian Y, Bloch W, Werner N, et al. Acute Effects of Different Exercise Protocols on the Circulating Vascular. *Front Physiol* 2016 Dec;7(643):1–10.
58. Mooren FC, Viereck J, Krüger K, Thum T. Circulating micrornas as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 2014 Feb;306(4):557–63.

ANEXO

ANEXO A - Comprovante de submissão do artigo científico.



Gilberto Morais <moraishgilbertojr@gmail.com>

Successfully received: submission Acute neuromuscular physical exercise promotes responses in circulating levels of miR-146a among older adults with type 2 diabetes for Journal of Diabetes and Its Complications

5 mensagens

Journal of Diabetes and Its Complications <EviseSupport@elsevier.com>
 Responder a: jdiabcomplic@elsevier.com
 Para: moraishgilbertojr@gmail.com

6 de março de 2017 20:42

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: JDC_2017_205

Title: Acute neuromuscular physical exercise promotes responses in circulating levels of miR-146a among older adults with type 2 diabetes

Journal: Journal of Diabetes and Its Complications

Dear Mr. Morais Junior,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Journal of Diabetes and Its Complications. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=JDC and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Diabetes and Its Complications

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2017 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.